

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: A61K 38/17, 39/39, 48/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/17084 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Mai 1997 (15.05.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04791 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. November 1996 (04.11.96) (30) Prioritätsdaten: 195 41 284.2 6. November 1995 (06.11.95) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: KALDEN, Joachim, Robert [DE/DE]; Krankenhausstrasse 12, D-91054 Erlangen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HERRMANN, Martin [DE/DE]; Würzburger Weg 4, D-91077 Neunkirchen (DE). VOLL, Reinhard [DE/DE]; Leimbergerstrasse 8, D-91052 Erlangen (DE). BERTLING, Wolf, Maximilian [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE). VON DER MARK, Klaus [DE/DE]; Zugemachtes Feld 6, D-91334 Hemhofen (DE). ZOLLER, Otmir [DE/DE]; Veit-Stoß-Strasse 13, D-91056 Erlangen (DE). (74) Anwälte: BISSEL, Christian usw.; Nürnberger Strasse 71, D-91052 Erlangen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: DRUG, IN PARTICULAR FOR MODULATING THE IMMUNOLOGICAL RESPONSE FOR THE CONTROL OF VIRUSES, TUMOURS, BACTERIA AND PARASITES (54) Bezeichnung: MEDIKAMENT, INSBESONDERE ZUR MODULATION DER IMMUNANTWORT BEI DER BEKÄMPFUNG VON VIREN, TUMOREN, BAKTERIEN UND PARASITEN (57) Abstract <p>The invention relates to a drug, in particular for modulating the immunological response for the control of viruses, tumours, bacteria and parasites, one of the following group of selected active substances being included to affect phosphatid lyserine-dependent phagocytosis: annexins, annexin antibodies, annexin ligands or phosphatid lyserine.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Medikament, insbesondere zur Modulation der Immunantwort bei der Bekämpfung von Viren, Tumoren, Bakterien und Parasiten, wobei zur Beeinflussung der phosphatidlyserinabhängigen Phagozytose ein aus der folgenden Gruppe ausgewählter Wirkstoff enthalten ist: Annexin, Annexin-Antikörper, Annexin-Liganden oder Phosphatidlyserin.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Medikament, insbesondere zur Modulation der Immunantwort bei der Bekämpfung von Viren, Tumoren, Bakterien und Parasiten

Die Erfindung betrifft ein Medikament, insbesondere zur Modulation der Immunantwort bei der Bekämpfung von Viren, Tumoren, Bakterien und Parasiten. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines Wirkstoffs zur Herstellung eines Medikaments.

- 10 Phosphatidylserin ist ein negativ geladenes Phospholipid, das sich bei allen Zellen an der Innenseite der Zytoplasmamembran befindet. Gelegentlich kann jedoch ein Phosphatidylserinmolekül durch die Membran schwingen und somit auf die Außenseite der Zytoplasmamembran gelangen. Bei lebenden gesunden
- 15 Zellen wird auf die Außenseite gelangtes Phosphatidylserin sofort enzymatisch auf die Innenseite der Zytoplasmamembran zurücktransportiert. Bei alten und bei Plasmodium falciparum infizierten Erythrozyten, bei Sichelzellen, postinflammatorischen Granulozyten sowie bei apoptotischen Zellen bleibt das
- 20 Phosphatidylserin jedoch auf der Außenseite. Ab einer bestimmten Phosphatidylserindichte binden die Zellen über den "Phosphatidylserinrezeptor" an Phagozyten. Steigt die Phosphatidylserindichte weiter an und erreicht dabei einen bestimmten Schwellenwert, werden die Zellen extrem schnell phagozytiert (Engulfmentphagozytose). Bei diesem Vorgang kommt
- 25 es weder zum Freisetzen von Zellinhaltsstoffen noch zu einer Aktivierung des Immunsystems. Aus diesem Grund wird dieser Phagozytoseweg "nichtinflammatorisch" genannt.
- 30 Bei der Beseitigung gealterter Zellen, z.B. alter Erythrozyten und apoptotischer Zellen, wie postinflammatorischer Granulozyten, ist eine spezifische Immunsuppression durchaus sinnvoll und erwünscht, da in diesen Fällen eine inflammato-

rische Phagozytose sogar zu Autoimmunphänomenen führen könnte. Die nichtinflammatorische Phagozytose von Plasmodium falciparum infizierten Erythrozyten ist jedoch unter anderem für die ausgesprochen schlechte Immunantwort und die schwierige Immunisierung gegen Malaria verantwortlich. Keine bisher beschriebene Maßnahme oder Vorbeugung gegen Malaria berücksichtigt den Umstand, daß Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten über den phosphatidylserinabhängigen Engulfment-phagozytoseweg phagozytiert werden. - Medikamente, die diesen Phagozytoseweg beeinflussen, sind bisher unbekannt.

Ähnlich verhält es sich bei Virusinfektionen. Viren, die über phosphatidylserinabhängige Phagozytose aus apoptotischen Zellen in Phagozyten aufgenommen werden, können so der Immunüberwachung entgehen. So ist z.B. die Aufnahme von HIV in Monozyten, die ohne Auslösung des "respiratory bursts" vonstatten geht, für das frühe und vom Immunsystem unbemerkte Eindringen des HIV in den langlebigen Monozyten-Pool verantwortlich. Diese bisher unverstandene Infektion der Monozyten/Makrophagen wird für die Persistenz des HIV und somit für die Ausbildung des AIDS-Krankheitsbilds ursächlich verantwortlich gemacht. Obwohl der Infektionsweg von Monozyten/Makrophagen mit HIV bisher molekular noch nicht eindeutig identifiziert ist, ist eine Beteiligung von Phosphatidylserin und Phosphatidylserinrezeptor wegen der nichtinflammatorischen Phagozytose wahrscheinlich. So konnte z.B. gezeigt werden, daß Retrovirusgenome aus apoptotischem Debris in Zellen aufgenommen werden können und so diese Zellen infizieren. Da HIV in den Monozyten sehr lange überleben kann und, eventuell erst Jahre nach der Infektion, spontan freigesetzt wird, kann das menschliche Immunsystem das HIV nicht völlig aus dem Körper eliminieren. Da das HIV bei jeder Freisetzung das Immunsystem etwas schädigt, indem es die CD 4 positiven

- T-Zellen zerstört, kann sich so im Laufe meist mehrerer Jahre das Vollbild des AIDS ausbilden. Ähnliche Probleme existieren auch bei der Eliminierung von anderen in Phagozyten persistierenden bzw. sich vermehrenden Viren. Hier sind vor allem
- 5 weitere Retroviren und besonders die Untergruppe der Lentiviren zu nennen. Einige dieser Viren (EIAV, Meadi Visna Virus, CAEV) persistieren in den Phagozyten von Huftieren und führen dort zu Autoimmunkrankheiten. Keine bisher beschriebene Maßnahme oder Vorbeugung gegen HIV Infektion bzw. der Infektion
- 10 mit anderen in Phagozyten überlebenden Viren berücksichtigt den Umstand, daß apoptotische Zellen über den phosphatidylserinabhängigen Weg phagozytiert werden können. - Medikamente, die diesen Phagozytoseweg blockieren, sind bisher unbekannt.
- 15 Anders stellt sich die Situation bei Patienten mit Sichelzellanämie dar. Durch die ständige und extrem schnelle Phagozytose autologer, genetisch veränderter Erythrozyten kommt es bei den Patienten zu einer Anämie, die unbehandelt in schweren Fällen zum Tod führen kann. Hier steht weniger die Tatsache
- 20 im Vordergrund, daß die phosphatidylserinvermittelte Phagozytose nichtinflammatorisch verläuft, als vielmehr der Umstand, daß sie extrem schnell und effizient Phosphatidylserintragende Zellen beseitigt. - Da es bisher keine Medikamente gibt, die diesen Phagozytoseweg blockieren, wird die Sichelzellanämie bisher mit wiederholten Bluttransfusionen behandelt.
- 25

Ein ähnliches Problem wie bei der Sichelzellanämie ergibt sich auch beim Lagern von Erythrozyten zur Transfusion. Auch

30 bei Lagerung unter Blutbankbedingungen exprimiert eine zunehmende Anzahl Erythrozyten Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche. Dies führt nach der Transfusion dazu, daß diese Erythrozyten sehr schnell von Phagozyten abgeräumt und so

wirkungslos werden. - Da es bisher keine Medikamente bzw. Zusätze zu Blutkonserven gibt, die diese Phagozytose verhindern, ist die Lagerung von Erythrozyten zeitlich strikt limitiert.

5

Bei der Herstellung von Tumorstoffen werden die in den Körper der Patienten bzw. Versuchstiere zurückgegebenen Tumorzellen bestrahlt, um eine weitere Verbreitung des Tumors zu verhindern. Da unter diesen Umständen in den Tumorzellen
10 Apoptose induziert wird und diese dann nichtinflammatorisch über den phosphatidylserinabhängigen Engulfmentphagozytoseweg beseitigt werden, kommt es meist zu einer relativ schwachen Immunantwort gegen die jeweilige Tumorstoffe. - Da bisher
keine Substanzen bekannt sind, die den phosphatidylserin-
15 abhängigen Phagozytoseweg blockieren, werden bisher klassische Immunisierungswege und Adjuvantien verwendet, um die Immunantwort gegen Tumorzellen zu steigern.

Nach dem Stand der Technik sind des weiteren Annexine bekannt. Diese bilden eine hochkonservierte Familie zellulärer
20 Proteine, die von höheren Pflanzen, über Wirbellose, Fische und Vögel bis hin zu den Säugetieren gefunden werden (Nomenklatur: Crumpton MJ and Dedman JR, 1990: "Protein terminology tangle"; Nature 345: 212). Diese zytoplasmamembran-
25 assoziierten Proteine besitzen entweder ein niedrigeres (32 kD bis 38 kD) oder aber ein höheres (ca. 67 kD) Molekulargewicht. Sie zeichnen sich außerdem durch eine Affinität zu Ca^{++} und Phospholipiden aus. Eine hochkonservierte Core-Struktur besteht aus vier oder acht Wiederholungen von je 70
30 Aminosäuren, die jeweils einen Endonexinbereich mit 17 Aminosäuren enthalten, die an der Ca^{++} -Bindung beteiligt sind. In den aminoterminalen Regionen der unterschiedlichen Annexine werden keine signifikanten Ähnlichkeiten gefunden, was zu

der Spekulation geführt hat, daß diese Domäne für die unterschiedlichen Funktionen der Annexine verantwortlich ist. Obwohl für Annexine eine Vielzahl von Funktionen postuliert wurden, wie z.B. die Inhibition der Phospholipase A₂ und der Blutgerinnung, sowie eine mögliche Beteiligung an Signaltransduktion, Zellwachstum und Differenzierung, konnte bisher keine eindeutige biologische Rolle für die Annexine etabliert werden (Morgan MO und Fernandez MP, 1991: "Annexins and signal transduction" in Bailey JM (ed): "Advances in Prostaglandine, Leukotrien, Lipoxin and PAF Research"; New York: Plenum Press: 107-122).

Die Röntgenstrukturanalyse der Annexine vom Typ V aus Mensch, Huhn und Ratte ergab, daß Annexin V ein kanalbildendes integrales Membranprotein ist (Huber R, Römisch J, Paques E, 1990: "The crystal and molecular structure of human Annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes"; The EMBO Journal 9: 3867-3874). Das Protein wird in Zytoplasma und Kern gefunden. Obwohl es nur partiell in der Innenseite in die Zytoplasmamembran integriert ist, konnte eine spannungsabhängige Kalziumkanalaktivität nachgewiesen werden. Außerdem wird Annexin V auch auf der Oberfläche von Chondrozyten gefunden, wo es an der Knorpelkalzifizierung beteiligt ist (Pfäffle M, Ruggiero F, Hofmann H, Fernandez MP, Selmin O, Yamada Y, Garrone R und von der Mark K, 1988: "Biosynthesis, secretion and extracellular localization of anchorin CII, a collagen-binding protein of the calpactin family"; The EMBO Journal 7/8, 2335-2342).

Die nach dem Stand der Technik bekannten Medikamente und Verfahren, insbesondere die heutzutage eingesetzten Adjuvantien stimulieren das Immunsystem unspezifisch. Bisher ist noch kein Agens beschrieben, das insbesondere die Engulfmentphago-

zytose von Phosphatidylserin tragenden Zellen verhindert und so zu einer spezifischen Immunstimulation führt. Besonders hervorzuheben sind die Nachteile, die bei nichtinflammatorischem Abräumen von Impfstoffen und Viren entstehen. Einerseits führt das zum wirkungslosen Abbau von Impfstoffen, andererseits zur Viruspersistenz.

Da bei der Sichelzellanämie bereits junge Erythrozyten Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche tragen, werden sie von den körpereigenen Phagozyten entfernt. Das trägt nachteiligerweise zur Anämie der Patienten bei.

Auch für die Lagerung von Blut und Erythrozyten sind keine Medikamente bzw. Zusätze bekannt, die den Abbau der Spendererythrozyten durch die Empfängerphagozyten nach der Transfusion verhindern. Das führt bislang zu einer relativ kurzen Lagerungsfähigkeit von Blutkonserven und Erythrozytenkonzentraten bzw. zu einem deutlichen Verlust an Wirksamkeit bei länger gelagerten Konserven.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Insbesondere soll ein Medikament bzw. die Verwendung eines Wirkstoffs angegeben werden, welches/r eine Erhöhung der Immunität gegen Viren, Tumoren, Bakterien und Parasiten bewirkt.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Patentansprüche 1 und 6 gelöst. Zweckmäßige Weiterbildungen ergeben sich aus den Merkmalen der Patentansprüche 2 bis 5 bzw. 7 bis 17.

Nach Maßgabe der Erfindung ist in einem Medikament, insbesondere zur Modulation der Immunantwort bei der Bekämpfung von Viren, Tumoren, Bakterien und Parasiten, zur Beeinflussung

der phosphatidylserinabhängigen Phagozytose, ein aus der folgenden Gruppe ausgewählter Wirkstoff enthalten: Annexin, Annexin-Antikörper, Annexin-Liganden, Phosphatidylserin oder Phosphodiesterase.

5

Erfindungsgemäß ist daneben die Verwendung eines Wirkstoffs zur Herstellung eines Medikaments, insbesondere zur Modulation der Immunantwort bei der Bekämpfung von Viren, Tumoren, Bakterien und Parasiten, vorgesehen, wobei der Wirkstoff zur

10 Beeinflussung der phosphatidylserinabhängigen Phagozytose aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Annexin, Annexin-Antikörper, Annexin-Liganden, Phosphatidylserin oder Phosphodiesterase.

15 Durch die Zugabe eines der erfindungsgemäßen Wirkstoffe wird der Annexinspiegel verändert und/oder die Verteilung von Annexinen verändert. Des weiteren können damit die Wirkorte oder Wirkpartner des Phosphatidylserins modifiziert werden.

20 Durch Annexin, vorzugsweise durch Annexin V, kann die phosphatidylserinabhängige Phagozytose, insbesondere die Engulfmentphagozytose, moduliert oder inhibiert werden. Außerdem kann beispielsweise durch Entfernen bzw. eine Blockade von Annexinen, insbesondere von Annexin V, die Engulfmentphagozytose moduliert oder stimuliert werden.

25

Besondere Bedeutung ist der Anwendung im human- bzw tiermedizinischen Bereich zuzumessen, wo in vielen etablierten, aber auch in experimentellen Therapieformen eine Immunmodulation erwünscht ist. So ist in der Behandlung von Tumorerkrankungen und von Virusinfektionen oft eine Immunstimulation erwünscht, wohingegen bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und bei Autoimmunerkrankungen eher eine Immunsuppression erwünscht ist.

30

Ein wichtiges Einsatzgebiet für die Blockade der nichtinflammatorischen phosphatidylserinabhängige Engulfmentphagozytose ergibt sich aus der daraus resultierenden spezifischen "Adjuvanswirkung". Phosphatidylserin tragende Zellen werden nach der Blockade des nichtinflammatorischen phosphatidylserinabhängige Engulfmentphagozytosewegs über einen inflammatorischen immunstimulatorischen Alternativweg phagozytiert, was mit einer massiv erhöhten Immunantwort einhergeht. Für diese "Adjuvanswirkung" ergeben sich die unterschiedlichsten Anwendungsgebiete, z.B. in der Humanmedizin. Zum einen kann dadurch die Immunogenität von Tumorstoffen gesteigert werden, wenn diese aus bestrahlten und somit größtenteils apoptotischen Tumorzellen bestehen. Weiterhin ist es möglich, eine Immunantwort gegen solche Tumorzellen zu erzielen, die aus therapeutischen Gründen in situ radioaktiv bestrahlt werden. In diesem Fall würde eine tumorspezifische Immunantwort bei der Beseitigung der Resttumormasse den Therapieerfolg steigern. Ein ähnlicher Effekt kann auch parallel zu einer Zytostatikatherapie mit apoptoseinduzierenden Agentien, wie z.B. Cisplatin und Hydroxy-Harnstoff, zu einer massiven tumorspezifischen Immunstimulation führen. Auch bei der Behandlung von Virusinfektionen, z.B. von solchen Viren, die in Phagozyten persistieren, führt die Blockierung des phosphatidylserinabhängigen Engulfmentphagozytosewegs zu einer spezifischen Immunstimulation. Als besonders wichtiges Beispiel in diesem Zusammenhang muß die Behandlung der Infektionen mit Lentiviren und HIV angesehen werden. Ein von der Zelle "unbemerkt" phosphatidylserinabhängiges Eindringen der Viren führt zur Viruspersistenz im langlebigen Monozyten/Makrophagen-Pool. Die Viruspersistenz führt bei den allermeisten Infizierten nach einer mehr oder minder langen Latenzzeit zum Tode. Annexine, bevorzugt Annexin V, sind für die Behandlung von HIV-

Infizierten geeignet, da inflammatorisch phagozytiertes apoptotisches Material in den Phagozyten einen "respiratory burst" auslöst und so zur Zerstörung der Vireng Genome führen würde.

5

Weiterhin können durch die Blockierung der phosphatidylserinabhängigen Engulfmentphagozytose unerwünschte Zellverluste in vivo und in vitro vermieden werden. Das ist sowohl bei der Lagerung von erythrozytenhaltigen Blutkonserven als auch als
10 Medikament für Patienten mit Sichelzellanämie von großer Bedeutung.

Beispiele:

- 15 1. Einsatz von Annexinen, bevorzugt Annexin V, als Adjuvantien für Tumorstoffen

Zur Produktion von Tumorstoffen aus von Patienten isolierten Tumorzellen, werden diese vor der Reinjektion in
20 den Patienten radioaktiv bestrahlt, um ein Anwachsen zu verhindern. Während der dadurch induzierten Apoptose wird auf der Oberfläche der Tumorzellen Phosphatidylserin exponiert, was zu einer schwachen Immunogenität der Tumorstoffe führt. Direkt vor der Injektion werden die be-
25 strahlten Tumorzellen *ex corpore* mit Annexinen, bevorzugt Annexin V, inkubiert um die phosphatidylserinabhängige Engulfmentphagozytose im Patienten zu blockieren. Zusätzlich wird an die Stelle der Injektion ein Annexin, bevorzugt Annexin V, Bolus gesetzt, um die Wirkung lokal weiter zu verstärken.
30

2. Einsatz von Annexinen, bevorzugt Annexin V, als Immunstimulans bei der Chemo- und Strahlentherapie

Bei der therapeutischen radioaktiven Tumorbestrahlung sowie bei der Behandlung mit Zytostatika wird *in corpore* in einer Vielzahl von Tumorzellen Apoptose induziert. Um ein nichtinflammatorisches Abräumen der toten Zellen zu verhindern und die damit verbundene schwache Immunantwort zu verstärken, werden vor oder unmittelbar nach der Strahlen- bzw. Chemotherapie Annexine, bevorzugt Annexin V, in den Tumor injiziert. Dadurch erfolgt das Abräumen der toten Tumorzellen über einen inflammatorischen Phagozytoseweg und führt so zu einer verstärkten Immunantwort gegen den Resttumor.

15

3. Lagerung von Vollblut und Erythrozytenpräparaten

Zu Vollblut- bzw. Erythrozytenkonzentraten werden Annexine, bevorzugt Annexin V, zugefügt, um nach der Transfusion den Abbau der Phosphatidylserin tragenden Erythrozyten zu verlangsamen und so die Wirksamkeit der Transfusion zu erhöhen. Die Annexine, bevorzugt das Annexin V, können in diesem Fall entweder direkt nach der Blutabnahme oder aber auch erst vor der Transfusion zugegeben werden.

25

4. Einsatz von Annexinen, bevorzugt Annexin V, bei Patienten mit Sichelzellanämie

4.a Klassische Lösung mit Annexin-, bevorzugt Annexin V-, Infusionen

30

Um die Phagozytose der Sichelzellen zu verhindern, die bei diesem Krankheitsbild entscheidend zur Anämie bei-

trägt, werden sehr stark anämischen Patienten Annexine, bevorzugt eine Annexin V Lösung, intravenös verabreicht.

- 4.b Einsatz von Annexinen, bevorzugt Annexin V, im transient
5 gentherapeutischen Ansatz mit RNA-Virus abgeleiteten Vektoren

In diesem Ansatz wird ein Fusionsprotein aus Annexinen, bevorzugt Annexin V, mit einem Leaderpeptid mit Hilfe eines transienten RNA-Vektorsystems (z.B. einem vom Poliovirus abgeleiteten System) in Blutzellen, z.B. Monozyten, zur Expression gebracht. Auf diese Weise blockiert diese
10 transiente *in situ* Produktion über einen längeren Zeitraum als eine Infusion die Phagozytose der Sichelzellen. Da RNA-abhängige Expressionssysteme sich weder in die genomische DNA der Wirtszellen integrieren noch vertikal verbreiten, ist die Expression der Annexine nur transient, was die Risiken der Auslösung einer Autoimmunopathie minimiert.
15

20

5. Auch bei der Behandlung von Infektionen mit Viren, z.B. von solchen, die in Phagozyten persistieren, führt die Blockierung des phosphatidylserinabhängigen Engulfment-phagozytosewegs zu einer spezifischen Immunstimulation.
25 Als besonders wichtiges Beispiel in diesem Zusammenhang muß die Behandlung der Infektionen mit Lentiviren und HIV angesehen werden. Ein von der Zelle "unbemerkt" Eindringen der Viren führt zur Viruspersistenz im langlebigen Monozyten/Makrophagen-Pool und bei den allermeisten
30 Infizierten nach einer mehr oder minder langen Latenzzeit zum Tode. Annexine, bevorzugt Annexin V, sind für die Behandlung von HIV geeignet, da inflammatorisch phagozytiertes apoptotisches Material in den Phagozyten einen

"respiratory burst" auslöst und so zur Zerstörung der Virengenome führt.

Patentansprüche

1. Medikament, insbesondere zur Modulation der Immunantwort bei der Bekämpfung von Viren, Tumoren, Bakterien und Parasiten, wobei zur Beeinflussung der phosphatidlyserinabhängigen Phagozytose ein aus der folgenden Gruppe ausgewählter Wirkstoff enthalten ist: Annexin, Annexin-Antikörper, Annexin-Liganden, Phosphatidlyserin oder Phosphodiesterase.
5
2. Medikament nach Anspruch 1, wobei das Annexin ein Annexin vom Typ V ist.
10
3. Medikament nach Anspruch 1, wobei der Annexin-Antikörper ein Anti-Annexin V Antikörper ist.
15
4. Medikament nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Annexin Bestandteil eines Fusionsproteins ist.
5. Medikament nach Anspruch 4, wobei das Fusionsprotein mit einem, vorzugsweise vom Poliovirus abgeleiteten, RNA-Vektor gekoppelt ist.
20
6. Verwendung eines Wirkstoffs zur Herstellung eines Medikaments, insbesondere zur Modulation der Immunantwort bei der Bekämpfung von Viren, Tumoren, Bakterien und Parasiten, wobei der Wirkstoff zur Beeinflussung der phosphatidlyserinabhängigen Phagozytose aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Annexin, Annexin-Antikörper, Annexin-Liganden, Phosphatidlyserin oder Phosphodiesterase.
25
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das Annexin ein Annexin vom Typ V ist.
30
8. Verwendung nach Anspruch 6, wobei der Annexin-Antikörper ein Anti-Annexin V Antikörper ist.
35

9. Verwendung nach Anspruch 6 oder 7, wobei das Annexin Bestandteil eines Fusionsproteins ist.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei das Fusionsprotein mit
5 einem, vorzugsweise vom Poliovirus abgeleiteten, RNA-Vektor gekoppelt ist.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 10, wobei die
10 durch den Wirkstoff hervorgerufene Beeinflussung eine Blockade der phosphatidlyserinabhängigen Phagozytose ist.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 11, wobei die
durch den Wirkstoff hervorgerufene Beeinflussung eine Stimulation der phosphatidlyserinabhängigen Phagozytose ist.
- 15 13. Verwendung nach Anspruch 11, wobei eine Immunstimulation durch die Blockade und/oder eine Verhüllung und/oder eine Maskierung und/oder eine Entfernung von extrazellulär membranständig lokalisiertem Phosphatidlyserin bewirkt wird.
- 20 14. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 13, wobei der Wirkstoff als Modulator einer Immunantwort verwendet wird.
- 25 15. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 14, wobei der Wirkstoff als Adjuvans in der Tumorthherapie, für Tumorstoffe, in der Virustherapie, insbesondere zur Behandlung von Retrovirusinfektionen, Lentivirusinfektionen und HIV-Infektionen, und zur Behandlung der Malaria sowie in der Malariaimmunisierung verwendet wird.
- 30 16. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 15, wobei der Wirkstoff zur Therapie der Sichelzellenanämie verwendet wird.
- 35 17. Verwendung nach einem der Ansprüche 6 bis 16, wobei der Wirkstoff zur Steigerung der Haltbarkeit von Erythrozyten

enthaltenden Blutkonserven oder Blutersatzstoffen verwendet wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/04791

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K38/17 A61K39/39 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	DE 195 41 284 A (KALDEN JOACHIM ROBERT PROF DR) 30 May 1996 see the whole document ---	1-17
A	WO 93 11222 A (DARTMOUTH COLLEGE ;GOULDING NICOLAS J (GB)) 10 June 1993 ---	
A	WO 93 06230 A (GEN HOSPITAL CORP) 1 April 1993 -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *a* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 March 1997

Date of mailing of the international search report

18.03.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/04791

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19541284 A	30-05-96	NONE	
-----	-----	-----	-----
WO 9311222 A	10-06-93	US 5314992 A	24-05-94
-----	-----	-----	-----
WO 9306230 A	01-04-93	CA 2116227 A	01-04-93
		EP 0605561 A	13-07-94
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intr onales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04791

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K38/17 A61K39/39 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	DE 195 41 284 A (KALDEN JOACHIM ROBERT PROF DR) 30.Mai 1996 siehe das ganze Dokument ---	1-17
A	WO 93 11222 A (DARTMOUTH COLLEGE ;GOULDING NICOLAS J (GB)) 10.Juni 1993 ---	
A	WO 93 06230 A (GEN HOSPITAL CORP) 1.April 1993 -----	

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4.März 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18.03.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Rempp, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04791

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19541284 A	30-05-96	KEINE	
WO 9311222 A	10-06-93	US 5314992 A	24-05-94
WO 9306230 A	01-04-93	CA 2116227 A	01-04-93
		EP 0605561 A	13-07-94

DERWENT- 1996-260875**ACC-NO:****DERWENT-** 200379**WEEK:**

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Immuno-modulation by control of phosphatidyl-serine dependent phagocytosis - by changing level or distribution of annexin, used e.g. in treatment of tumours and viral infections

INVENTOR: BERTLING, W M; HERRMANN, M ; KALDEN, J R ; VOLL, R ; VON DERN MARK, K ; MARK, K ; ZOLLER, O ; VON DER MARK, K

PATENT-ASSIGNEE: KALDEN J R[KALDI]**PRIORITY-DATA:** 1995DE-1041284 (November 6, 1995)**PATENT-FAMILY:**

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
EP 1356818 A2	October 29, 2003	G	000	A61K 038/17
DE 19541284 A1	May 30, 1996	N/A	005	A61K 038/17
WO <u>9717084</u> A1	May 15, 1997	G	019	A61K 038/17
EP 859628 A1	August 26, 1998	G	000	A61K 038/17
DE 19541284 C2	September 24, 1998	N/A	000	A61K 038/17
JP 2000500124 W	January 11, 2000	N/A	016	A61K 038/00
EP 859628 B1	July 30, 2003	G	000	A61K 038/17
DE 59610633 G	September 4, 2003	N/A	000	A61K 038/17

DESIGNATED-STATES: AT CH DE DK ES FI FR GB GR IT LI SE CA JP US AT BE CH
DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE AT CH DE DK
ES FI FR GB GR IT LI SE AT CH DE DK ES FI FR GB GR IT
LI SE

CITED-DOCUMENTS: DE 19541284; WO 9306230 ; WO 9311222**APPLICATION-DATA:**

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
EP 1356818A2	Div ex	1996EP-0938062	November 4, 1996
EP 1356818A2	N/A	2003EP-0017188	November 4, 1996
EP 1356818A2	Div ex	EP 859628	N/A
DE 19541284A1	N/A	1995DE-1041284	November 6, 1995

WO 9717084A1	N/A	1996WO-EP04791	November 4, 1996
EP 859628A1	N/A	1996EP-0938062	November 4, 1996
EP 859628A1	N/A	1996WO-EP04791	November 4, 1996
EP 859628A1	Based on	WO <u>9717084</u>	N/A
DE 19541284C2	N/A	1995DE-1041284	November 6, 1995
JP2000500124W	N/A	1996WO-EP04791	November 4, 1996
JP2000500124W	N/A	1997JP-0517831	November 4, 1996
JP2000500124W	Based on	WO <u>9717084</u>	N/A
EP 859628B1	N/A	1996EP-0938062	November 4, 1996
EP 859628B1	N/A	1996WO-EP04791	November 4, 1996
EP 859628B1	Based on	WO <u>9717084</u>	N/A
DE 59610633G	N/A	1996DE-0510633	November 4, 1996
DE 59610633G	N/A	1996EP-0938062	November 4, 1996
DE 59610633G	N/A	1996WO-EP04791	November 4, 1996
DE 59610633G	Based on	EP 859628	N/A
DE 59610633G	Based on	WO <u>9717084</u>	N/A

INT-CL A61K031/685, A61K038/00 , A61K038/17 , A61K038/46 ,
(IPC): A61K039/39 , A61K039/395 , A61K047/48 , A61K048/00 ,
 A61P007/06 , A61P031/00 , A61P031/12 , A61P033/06 ,
 A61P035/00 , A61P037/02

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 19541284A

BASIC-ABSTRACT:

Modulation of phosphatidylserine (PS)-dependent phagocytosis (engulfment phagocytosis) comprises changing the level and/or distribution of annexin and/or modifying the active site and/or partner.

USE - Annexin V (Ia) is admin. to modulate the immune response, partic. in tumour therapy, tumour vaccines, treatment of viral infections (specifically HIV), treatment of sickle cell anaemia and malaria (or malaria immunisation). Blocking PS-dependent phagocytosis can also prevent cell loss during storage of blood prods. used e.g. to treat sickle cell anaemia (all claimed). (I) are admin. by injection or it is expressed as a fusion protein with a leader sequence, using a transient RNA vector system in blood cells.

ADVANTAGE - Blocking PS-dependent phagocytosis means that PS-carrying cells undergo phagocytosis by other pathways, leading to a far greater immune response, i.e. the treatment provides an adjuvant effect to increase immunogenicity of tumour vaccines, etc. In viral infections, apoptotic material taken into phagocytes causes a

respiratory burst that destroys the viral genome.

CHOSEN- Dwg.0/0

DRAWING:

TITLE- IMMUNO MODULATE CONTROL PHOSPHATIDYL SERINE DEPEND

TERMS: PHAGOCYTOSIS CHANGE LEVEL DISTRIBUTE TREAT TUMOUR VIRUS
INFECT

DERWENT-CLASS: B04

CPI-CODES: B05-B01P; B14-A02; B14-H01B; B14-S11C;

CHEMICAL- Chemical Indexing M1 *01* Fragmentation Code M421 M423

CODES: M781 M903 P210 P312 P434 P633 P811 P812 V288 V752

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1996-082672

PUB-NO: WO009717084A1
DOCUMENT-IDENTIFIER: WO 9717084 A1
TITLE: DRUG, IN PARTICULAR FOR MODULATING THE IMMUNOLOGICAL RESPONSE FOR THE CONTROL OF VIRUSES, TUMOURS, BACTERIA AND PARASITES
PUBN-DATE: May 15, 1997

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
KALDEN, JOACHIM ROBERT	DE
HERRMANN, MARTIN	DE
VOLL, REINHARD	DE
BERTLING, WOLF MAXIMILIAN	DE
VON, DER MARK KLAUS	DE
ZOLLER, OTMAR	DE

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
KALDEN JOACHIM ROBERT	DE
HERRMANN MARTIN	DE
VOLL REINHARD	DE
BERTLING WOLF MAXIMILIAN	DE
VON DER MARK KLAUS	DE
ZOLLER OTMAR	DE

APPL-NO: EP09604791

APPL-DATE: November 4, 1996

PRIORITY-DATA: DE19541284A (November 6, 1995)

INT-CL (IPC): A61K038/17 , A61K039/39 , A61K048/00

EUR-CL (EPC): A61K038/17 , A61K039/39 , A61K048/00 , C07K016/18

ABSTRACT:

CHG DATE=19970705 STATUS=O>The invention relates to a drug, in particular for modulating the immunological response for the control of viruses, tumours, bacteria and parasites, one of the following group of selected active substances being included to affect

phosphatid lyserine-dependent phagocytosis: annexins, annexin antibodies, annexin ligands or phosphatid lyserine.